Aus der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

GLUCOSE–DEHYDROGENASE–MIKRO–METHODE ZUR GLUCOSEBESTIMMUNG AM AUTOANALYZER II

Einführung und Langzeiterprobung

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
Tübingen

vorgelegt von

INGBERT MILDNER

aus Neuler

1980

Aus der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

GLUCOSE–DEHYDROGENASE–MIKRO–METHODE ZUR GLUCOSEBESTIMMUNG AM AUTOANALYZER II

Einführung und Langzeiterprobung

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
Tübingen

vorgelegt von

INGBERT MILDNER
aus Neuler

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. H. Heimann
Berichterstatter: Professor Dr. M. Eggstein

gedruckt bei Fa. H.- J. Köhler , Reprografie-Betrieb, Tübingen

INHALT

		Seite
I.	HISTORISCHER RÜCKBLICK	1
II.	METHODIK	4
	1. Einführung der Glucose-Dehydrogenase-Methode	4
	2. Prinzip der Glucose-Dehydrogenase-Methode	5
	3. Materialien	6
	4. Geräte - Analysenschema	7
III.	DURCHFÜHRUNG DER ANALYSEN	9
	1. Kapillartechnik	9
	2. Analyzer II mit EDV-Einsatz	10
	3. Probenidentifizierung	10
	4. Präsentation der Auswertung	11
IV.	PRÜFUNG DER ZUVERLÄSSIGKEIT	13
	1. Linearität und Richtigkeit	13
	2. Präzision	15
	3. Langzeitpräzision	17
	4. Beschreibung der Gluc-DH-Handmethode	21
	5. Methodenvergleiche	22
	6. Störungen und Spezifität der Methode	27
V.	DISKUSSION	29
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	32
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	33

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548919_0045

I. HISTORISCHER RÜCKBLICK

Die Geschichte der Blutzuckerbestimmung kennzeichnet bis ins späte 19. Jahrhundert den Erkennungsprozeß der Zuckerkrankheit. Während schon Aretaios von Kappadozien (81-138 n.Chr.) eindrucksvoll Symptome der Zuckerkrankheit beschreibt - Durst und Harnflut und das Wort D i a b e t e s seit dem Altertum der Krankheit ihren Namen gibt, erhalten wir die früheste biochemische Erkenntnis, eine Angabe über den süßen Geschmack des Urins beim Zuckerkranken, im 17. Jahrhundert (Willis 1674).
Erst 1776 gelang Dobson die Reindarstellung von Zucker im Diabetikerharn (33).

Die erste "klinisch biochemische" Untersuchungsmethode stellt die "Gährungsprobe" von Francis Home (1780) dar. Damit konnte die Diagnose "Diabetes" durch Nachweis von Urinzucker gestellt werden (Cawley 1788). Auch die Differenzierung von Diabetes mellitus (honigsüß) und Diabetes insipidus (nicht schmeckend) war jetzt möglich. 1838 wiesen Bouchardat und Peligot nach, daß der Zucker des Urins Traubenzucker ist. Zuckerkristalle wurden zwar schon 1800 im Blut dargestellt, der direkte Zusammenhang von Blut- und Urinzucker aber erst 1862 von Pavy erkannt. Die Schwierigkeiten des Blutzuckernachweises dokumentieren Beschreibungen von Bouchardat, der 300 ml Blut zur Bestimmung benötigte (39, 44).

Praktikabel wurde die Glucosebestimmung erst durch die sogenannten Reduktionsproben, deren Autoren noch durchweg geläufig sind:
Trommer 1841, Fehling 1848 und Benedikt 1907 benutzten Kupfersulfat, Nylander 1883 Wismutnitrat, Hagedorn und Jensen 1923 Kaliumferricyanid als H-Ionen-Acceptor (18).

Bereits 1817 hatte Biot (3) die optische Aktivität des Zuckers beobachtet, seine Fähigkeit polarisiertes Licht nach rechts zu drehen. Seit 1841 fand das Polarimeter Eingang in die laufende Urinzuckerbestimmung im Hôtel-Dieu in Paris: "Par là, on pourra reconnaître le commencement de cette maladie dès ses premiers indices" (18).

Seit der epochemachenden Entdeckung des Insulins durch Banting und Best 1921 ist der Diabetes behandelbar. Blut- und Urin-Glucose-Bestimmung bekommen damit für die Behandlung und Kontrolle des Diabetes ein neues Gewicht.

Die ersten Arbeiten über enzymatische Bestimmungsmethoden erschienen 1928 bzw. 1938 (8,22). Gleichwohl waren "Farbstoffmethoden" nach dem Reduktionsprinzip, wie die Ortho-Toluidinblau-Methode (14) oder die Anilinmethode mit dem Nachweis von Hexosen und Ketosen (21) bis vor kurzem ebenso üblich wie die polarimetrische Urinzuckerbestimmung (35).

Die entscheidende Verbesserung enzymatischer Methoden liegt in der Spezifität für Glucose. Hemmend für eine schnellere Einführung waren zunächst die bequemere Handhabung der Farbstoff-Methoden besonders im Trend einer hektischen Automatisierung in den 60er Jahren, aber auch echte methodische Probleme, nämlich die Abhängigkeit von Zeit, Licht, Temperatur und pH (27) und schließlich die höheren Kosten.

Die seit 1957 für den klinischen Gebrauch entwickelte Glucose-Oxidase-Methode (13) erreichte nach den Verbesserungen durch Richterich und Colombo auch bei Probenmaterial im Mikrobereich mit 2 % eine gute Präzision (28). Damit war sie auch in günstiger Weise für die Automatisierung geeignet (38) und in den letzten Jahren die gängige

Routinemethode zur Blutglucosebestimmung. Der Begriff "Bestimmung der wahren Glucose" schien dieser Methode zunächst gerecht zu werden. Dennoch zeigte auch sie in der Anwendung Schwächen: Der entscheidende Fortschritt der Selektivität der Methode, die Oxidation der Glucose im ersten Reaktionsschritt, wurde durch den zweiten Schritt, die Ankopplung eines Leukofarbstoffs zur photometrischen Messung z.T. wieder vergeben. Das verwandte Chromogen war gegen die Luftoxidation empfindlich und dadurch beschränkt haltbar. Reduzierende Substanzen des Substrats konkurrieren mit dem Chromogen, so daß in praxi Ascorbinsäure, Gluthation und hohe Harnsäure-Konzentration zu falsch niedrigen Glucosewerten führen (15,20,25,41). Damit ist auch die Anwendbarkeit der Methode auf Gewebeuntersuchungen, Körperflüssigkeiten, besonders aber Urinuntersuchungen ausgeschlossen.

Derzeitige Referenzmethode zur Glucosebestimmung ist die Hexokinase-Methode. Ihr liegt eine zweistufige Reaktion zugrunde, die erstmals 1950 von Slein (32) beschrieben und seit 1962 klinisch verwandt wurde (2). Auch diese Methode ist inzwischen auf alle gängigen Analysenautomaten adaptiert worden (10,11,24,29,45). Sie ist theoretisch absolut selektiv. Höchstens durch unreine Enzympräparationen erscheint eine Beeinflussung durch Fruktose und Mannose möglich (34). Die breite Anwendung der Methode ist bisher am Kostenfaktor gescheitert.

II. METHODIK

1. Einführung der Glucose-Dehydrogenase-Methode

Seit 1975 steht mit der Glucose-Dehydrogenase-Methode die erste einstufige enzymatische Bestimmung für Glucose zur Verfügung (1,5,9,30,37). Nach den bisherigen Untersuchungen scheint diese Methode der Bestimmung mit Hexokinase gleichwertig zu sein.

Im Labor der Medizinischen Klinik Tübingen wurde seit 1973 die Blut- und Liquor-Glucose am Autoanalyzer I R mit der Glucoseoxidase-Peroxidase-Methode durchgeführt. Die Langzeitpräzision (Schmülling 1975) (36) über 15 Monate mit einem Variationskoeffizient von über 5,6 % gibt ein ungeschminktes Bild der Güte des Verfahrens. Auch eine Revision der Methode (19.8.-18.10.1976) konnte die Präzision lediglich auf einen Variationskoeffizienten von 4,1 % senken.

Tabelle I: Glucoseoxidase-Peroxidase Langzeitpräzision

Datum	N (Probenzahl)	$\bar{x}$ (mg/dl) (Mittelwert)	s (mg/dl) (Standard-abweichung)	VK (%) (Variations-koeffizient)
17.3.75 -10.8.76	3311	197,7	11,1	5,6
19.8.76 -18.10.76	325	227,2	9,3	4,1

Zu berücksichtigen ist außerdem, daß diese Werte in einem optimalen Bestimmungsbereich liegen. Die mangelnde Spezifität der Methode - falsch niedrige Werte durch Reduktionsmittel, falsch hohe Werte durch Oxidationsmittel - wird also im niedrigen Bereich unter 50 mg/dl (2,5 mmol/l) zu

erheblich größeren Schwankungen führen. Damit genügte die Methode den Anforderungen nicht mehr.

Eine Nachfolgemethode mußte folgenden Kriterien entsprechen:

a) Den theoretischen Forderungen Spezifität, Richtigkeit, Präzision, Empfindlichkeit (27).

b) Einfach durchführbar, wenig störanfällig in der chemischen Reaktion, geringer Enzymverbrauch, wirtschaftlich vertretbar.

c) Geringe Probenmenge, simple Probennahme auch durch nicht ärztliches Personal.

d) Einheitliche Probennahme ob
   - seriell, mechanisch
   - manuell, im Notfall
   - oder für ein Alternativgerät bestimmt.

e) Positive Probenidentifizierung für die Anwendbarkeit im Mittel- und Großlabor.

f) Analytische Zuverlässigkeit in der Langzeiterprobung.

2. Prinzip der Glucose-Dehydrogenase-Methode

Gluc-DH^{+} katalysiert die Dehydrierung von ß-D-Glucose zu D-Gluconolacton, wobei der frei werdende Wasserstoff auf NAD übertragen wird:

$$\text{ß-D-Glucose} + \text{NAD} \xrightarrow[\text{(Mutarotase)}]{\text{Gluc-DH}} \text{D-Gluconolacton} + \text{NADH}_2$$

+) Gluc DH: ß-D-Glucose: NAD-Oxidoreductase E.C. 1.1.1.47
Mutarotase: Aldose-1-epimerase E.C. 5.1.3.3.

Die Menge des gebildeten $NADH_2$ ist der Glucose proportional und photometrisch meßbar. Gluc-DH ist spezifisch für ß-D-Glucose. In wässriger Lösung liegt Glucose stets in α- und ß-Form im Verhältnis 1:2 vor. Damit nach Abreagieren der ß-Form nicht die langsame Eigenmutarotation der geschwindigkeitsbestimmende Schritt wird, enthält das Testsystem Mutarotase zur Beschleunigung der Mutarotation (16).

3. Materialien

Lanzetten (Firma ASID, München)
Heparinisierte Glaskapillaren 20 µl (Firma Biotechnic, Hamburg)
Mikrogefäße (Firma Eppendorf, Hamburg)
Spezialpapier für Schreiber (Firma Blumberg, Ratingen)

Reagenzien

Arbeitslösungen für die Gluc-DH-Methode

1. Enteiweißungsmittel

1.1 Uranylacetat (0,08 %):
4 g Uranylacetat werden in 5 l physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

1.2 Perchlorsäure/Perchloratlösung (0,33 n) (Merck Nr. 9431) für die Bestimmung von Lösungen mit geringem Eiweißgehalt.

2. Reaktionslösung (Haltbarkeit 4 Wochen):
Aus Merck System Reagenzien Nr. 14051 und 14055 werden in 1 l Puffer 2 Flaschen Enzymgemisch (5,2 kU/l Gluc-DH und 0,11 kU/l Mutarotase), 2 Flaschen NAD (1,1 mmol/l) sowie 1 ml Triton x 100 gelöst.

3. Als Glucosestandards werden Lösungen der Firma Merck (Nr. 9423) und Boehringer (Preziset-Glucose) eingesetzt und mit Lösung 1,2 oder aqua bidest. 2+50 verdünnt.

4. Spüllösung für den Probennehmer 1 l aqua bidest. mit 1 ml Triton x 100 versetzt.

5. Reinigungslösung:
Zur täglichen Reinigung des Analyzer-Systems dient alkalische Hypochloridlösung (40 g/l) (Verdünnung der Natronbleichlauge 125 g/kg der Firma Nettenheimer und Simon-Collischon, Frankfurt).

Reagenzien für Vergleichsmessungen

Glucoseoxidase-Perid-Reagenzien (Nr. 12 40 44)
Hexokinase-Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (Nr. 15931)
jeweils von Boehringer, Mannheim.

4. Geräte - Analysenschema

Die mechanisierten Bestimmungen werden auf einem Einkanal-Autoanalyzer II der Firma Technicon, bestehend aus Pumpe II, Colorimeter mit 15 mm Durchflußküvette und Filter 340 nm durchgeführt. Der Probenteller der Firma IBM (Sampler Recorder 1084) gewährleistet über einen eingebauten Lochkartenleser gleichzeitig eine echte Probenidentifizierung und die Steuerung eines Auswerteprogramms (Bock und Eggstein) (4). Der Einkanalschreiber gewährleistet eine Kontrollablesung durch die Bestückung mit Schreiberpapier im Bereich von 0-500 mg/dl (27,8 mmol/l) Glucose und Einteilungen von 2,5 mg/dl Glucose. Die Auswertung der Analyse durch die EDV (elektronische Datenverarbeitung) steht über eine Schreibmaschine IBM 1053 sofort patientenzugeordnet zur Verfügung.

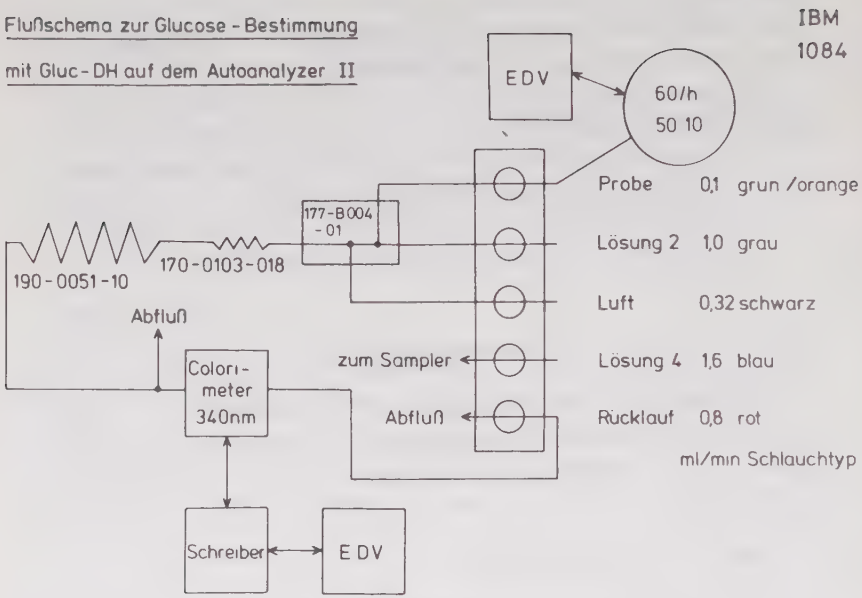


Abb. 1:

Wie das Analysenschema zeigt, wird vom zentrifugierten, enteiweißten Überstand der Probe 50 Sekunden abgesaugt, Lösung 2 (Enzymgemisch + NAD) zugefügt und mit Luft segmentiert. Die Reaktion läuft über Misch- und Verweilspiralen innerhalb von 13 Minuten ab. Diese Zeit ist ausreichend, um bei Proben mit einer Glukosekonzentration bis 500 mg/dl (27 mmol/l) ein stabiles Plateau zu erhalten, so daß kleinere Veränderungen der Reaktionsgeschwindigkeitkonstanten nicht in das Ergebnis eingehen können. Das gebildete $NADH_2$ wird nach Abtrennen der Luftsegmente bei 340 nm in einem Durchflußcolorimeter gemessen.

Die Vergleichsmessungen wurden am Photometer Eppendorf (M 1101) manuell durchgeführt.

III. DURCHFÜHRUNG DER ANALYSEN

1. Kapillartechnik

Die kapillare Mikroprobennahme wird seit langem bevorzugt (26). Im Kapillarblut werden praktisch gleiche Glucosewerte wie im arteriellen Blut gemessen (43).
Die Entnahme von venösem Blut erscheint zwar in der Klinik recht praktikabel, doch ist die Abschöpfung der Glucose durch die vor dem venösen System liegenden Muskelmassen und damit die arteriovenöse Differenz nicht abschätzbar (31). Sie wird zwischen 10 und 20 mg/dl geschätzt (7).

Die Probenahme erfolgt mit einer 20 µl Glaskapillare, die luftblasenfrei ohne äußere Benetzung gefüllt wird. Die gefüllte Kapillare wird in ein Mikrogefäß gebracht, das 500 µl Uranylacetat zur Enteiweißung enthält; eiweißarme Proben, wie Liquor, werden in Perchlorsäure-Perchloratlösung übergeführt. Der feinfleckige Eiweißniederschlag wird 1 Minute (7500 g) abzentrifugiert. Der Überstand ist für die mechanisierte oder manuelle Analyse einsetzbar.

Verändert die kapillare Mikroprobenahme die Empfindlichkeit der Methode?
Zur Abschätzung eines möglichen Fehlers vergleichen wir jeweils 10 identische (vorverdünnte) Proben und 10 Proben mit kapillarer Mikroverdünnung im wahrscheinlich kritischen Bestimmungsbereich um 50 mg/dl (2,8 mmol/l).

Tab. II:

	$\bar{x}$ (mg/dl)	s (mg/dl)	VK (%)	n
identische Proben	51,35	0,54	1,05	10
Mikrotechnik	51,53	0,54	1,05	10

Der Vergleich zeigt, daß durch Mikroprobenahme, auch im relativ niedrigen Bestimmungsbereich, die Empfindlichkeit der Methode nicht nachweisbar verändert wird.

2. Analyzer II mit EDV-Einsatz (4)

Die enteiweißten Proben werden mit einer Frequenz von 60/h angesaugt und bestimmt. Die Saugzeit der Probe beträgt 50 sec., das Waschintervall 10 sec.

Die Kalibrierung des Gerätes erfolgt über 2 Punkte am Folgepotentiometer des Schreibers, dessen Signal vom Rechner direkt verarbeitet wird.

1.) Einstellung eines Leerwerts mit aqua bidest. oder Perchlorsäure/Perchlorat und
2.) eines Glucosestandards 300 mg/dl (16,7 mmol/l).

Jede Analysenserie setzt sich aus zwei Leerwerten und zwei Glucosestandards (300 mg/dl) zur Kalibrierung, bis zu 20 Untersuchungsproben und einem Testserum zur Präzisionskontrolle zusammen. Diese erfolgt durch Monitrol II Lot Nr. XPT 62, Merz und Dade).
Die Richtigkeit wird täglich mit Precinorm U 606 (Firma Boehringer, Mannheim) geprüft.

3. Probenidentifizierung

Im Probenteller eingebaut ist ein Lochkartenleser, der jede Probe durch eine zugeordnete Kurzlochkarte identifiziert (Patientennummer, Geschlecht, Testnummer und Datum). Ein relativ konstantes Durchlauf-Zeitintervall ermöglicht eine starre Zuordnung der Kurzlochkarte zum analogen Meßwert des Photometers. Die Durchlaufzeit beträgt z.B. 817 sec. und toleriert Schwankungen von $\pm$ 20 Sekunden. Die tatsächlich erreichten Zeitschwankungen betragen jedoch maximal 10 Sekunden.

Ein der Kurzlochkarte am Serienende zugeordneter "analoger" Leerwert initiiert ein Auswerteprogramm, das über die beiden Kalibrierungsproben (0 und 300) die Analysenergebnisse durch lineare Inter- und Extrapolation ermittelt (s.Abb.2).

4. Präsentation der Auswertung

Die Auswertung erfolgt nach jedem Serienende sofort "on-line" durch das EDV-System der Klinik über eine zugehörige Laborschreibmaschine.

Abb. 2:

BLUTZUCKER-AUSWERTUNG 12.01.77 10.16 UHR

4. SERIE

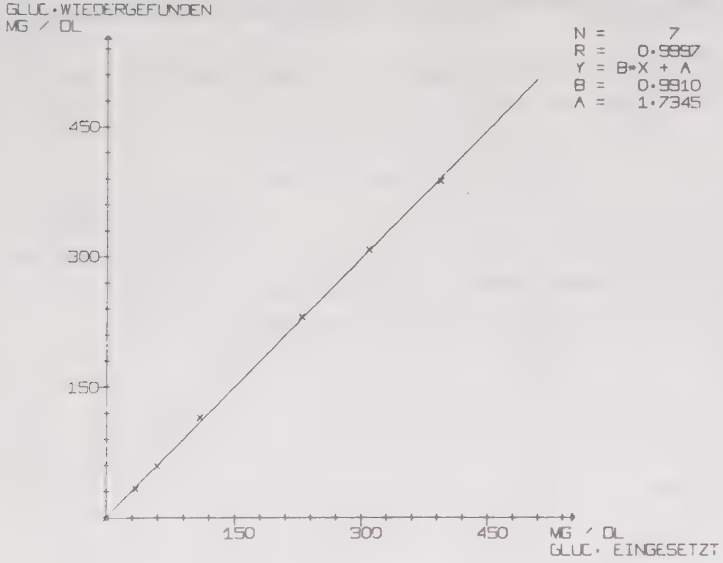
PATIENTENNAME	PAT.NR.	ST.	G.	TNR	E.NR.	VERD.	DATUM	BLUTZUCKER	UHR
EICHUNG MIT STANDARD 300 (3 SEC)									
..... VOLKER	238	A2V	M	12	56	1/ 1	12.01.77	90	9
.... FRANZ	244	C1	M	12	57	1/ 1	12.01.77	72	9
..... ILO	242	A5V	W	12	58	1/ 1	12.01.77	92	9
.... HUND	29053			12	59	1/ 1	12.01.77	52	9
..... BERTA	18321	B2H	W	12	59	1/ 1	12.01.77	217	9
..... RUSINA	181	B2H	W	12	60	1/ 1	12.01.77	122	9
..... ANNA	18326	B2H	W	12	61	1/ 1	12.01.77	156	9
..... KAET	111	B2H	W	12	62	1/ 1	12.01.77	178	9
... KARL	220	A1V	M	12	63	1/ 1	12.01.77	136	9
.... HUBERT OR	127	B1V	M	12	64	1/ 1	12.01.77	126	9
..... ERICH	18159	B1V	M	12	65	1/ 1	12.01.77	109	9
..... BARBARA	76	B1H	W	12	66	1/ 1	12.01.77	114	9
.... JOSEPHINE	18298	C1	W	12	67	1/ 1	12.01.77	108	9
..... PAUL	18208	C1	M	12	68	1/ 1	12.01.77	142	9
..... FRANZ	175	A5H	M	12	69	1/ 1	12.01.77	203	9
..... GEBH	86	B2V	M	12	70	1/ 1	12.01.77	134	9
..... MEHMET	63	B1H	M	12	71	1/ 1	12.01.77	237	9
..... CHRISTI	240	B2H	W	12	72	1/ 1	12.01.77	106	9
..... ANTON	235	B3V	M	12	73	1/ 1	12.01.77	95	9
..... L	64	B2H	W	12	74	1/ 1	12.01.77	276	9
* TESTSERUM *	32001							* 218	-15
* LEERWERT *	30195								

Der Ausdruck enthält in der Überschrift Datum und Uhrzeit der Auswertung sowie die Tagesseriennummer sowie tabellarisch: Patientennummer, Station (ST.), Geschlecht (G.), Testnummer der Bestimmung (TNR), laufende Ergebnisnummer des Tages (E.NR.), die Verdünnung, Datum, Ergebnis der Bestimmung in mg/dl und Uhrzeit der Probennahme.
Die korrekte Eichung wird am Serienbeginn dokumentiert: Eichung mit Standard 300 (mg/dl). Daneben Solldurchlaufzeit der Probe und Abweichung in Sekunden.
Größere Abweichungen der Solldurchlaufzeit, wie sie durch Auswechseln von Pumpschläuchen entstehen, können so rasch korrigiert werden. Das Präzisionsserum am Ende jeder Serie mit Angabe der Standardabweichung entscheidet über die sofortige "Freigabe" der Werte und Mitteilung an die Station über EDV.

IV. PRÜFUNG DER ZUVERLÄSSIGKEIT (27)

1. Linearität und Richtigkeit

Abb. 3: Linearität und Wiederfindung,
wässrige Standardlösungen in aufsteigender Konzentration bis 400 mg/dl (22 mmol/l) Glucose



LINEARITAET UND RICHTIGKEIT

DER GLUCOSE-BESTIMMUNG MIT GLUC-DH AM AUTOANALYZER II

Auf der Abszisse ist die eingewogene, auf der Ordinate die wiedergefundene Glucosekonzentration aufgetragen. Bis zu 400 mg/dl (22 mmol/l) zeigt sich eine gute Übereinstimmung mit einem Korrelationskoeffizienten von r = 0,9997 und einer fast idealen Regressionsgeraden von y = 0,9910 x + 1,7345.

Die Richtigkeit der Methode wurde durch kommerzielle Richtigkeitsseren geprüft: Im Bereich von 50, 30 und 20 mg/dl wurden eingewogene wässrige Standardlösungen benutzt.

Tab. III: Richtigkeitskontrolle mit käuflichen Seren und wässrigen Glucosestandards

	Sollwert (mg/dl)	Wiederfindung $\bar{x}$	N (Zahl der Bestimmungen)
Monitrol II (46A)	213 (Gluc-DH)	214,4	12
Precinorm U (606)	112 (Gluc-DH)	114,8	10
Fluinorm N (127 D)	98 (Hexokinase)	96,0	55
Monitrol I (137 A.B)	78 (Gluc-DH)	80,2	2
Standard 50	50	51,5	20
Standard 20	20	18,8	18

2. Präzision

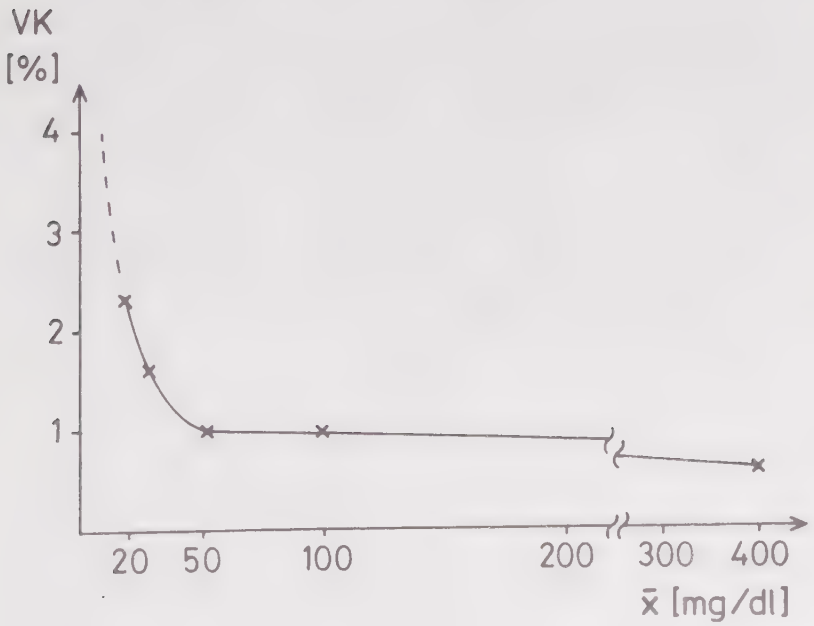
Apparative und methodische Präzision

Zur Beurteilung dieser beiden Fehlergruppen wurde die Bestimmung vorverdünnter Standards benützt, der Fehler der Probennahme also umgangen.

Tab. IV:

$\bar{x}$ (mg/dl)	s (mg/dl)	VK (%)	N (Anzahl)
405,6	2,34	0,6	20
101,4	1,08	1,0	14
51,5	0,54	1,0	20
29,2	0,43	1,6	18
18,8	0,43	2,3	18

Abb. 4: Das Verhältnis von Variationskoeffizient (%) zum Probenmittelwert (Konzentration in mg/dl) kennzeichnet die apparative und methodische Präzision



Es zeigt sich, daß der kritische Bereich der Methode um 20 mg/dl liegt.

Präzision in der Serie

Die Messungen zur Präzision in der Serie entsprechen der Routine: Die Probennahme erfolgt in Kapillartechnik aus drei Seren verschiedener Konzentration.

Tab. V:

$\bar{x}$ (mg/dl)	s (mg/dl)	VK (%)	N
220,2	2,7	1,2	17
117,1	0,5	0,4	20
52,4	1,25	2,4	15

Präzision von Tag zu Tag

Hierzu wurden vier Testseren zwischen 80 und 400 mg/dl sowie ein wässriger Standard von 25 mg/dl Glucose an mindestens 9 aufeinanderfolgenden Werktagen geprüft.

Tab. VI:

$\bar{x}$ (mg/dl)	s (mg/dl)	VK (%)	N
410,8	4,5	1,1	10 (D)
114,8	3,1	2,7	10
95,5	3,1	3,2	55
82,9	2,2	2,6	12 (D)
25,2	2,3	9,2	9 (D) (St)

(D) = Doppelbestimmungen
(St) = wässriger Glucose-Standard

Verschleppung

Die Verschleppung durch das Analysengerät schlägt an SMA Geräten (sequential multiple analyzer) äußerst empfindlich zu Buche, da die Einzelproben im Durchfluß nur durch Luft und einer möglichst gering zu haltenden Spüllösung segmentiert sind. Das Saug-Wasch-Verhältnis von 50:10 sec reicht aus, die Verschleppung in einer alternierenden Serie von Glucose 300 mg/dl und 51 mg/dl ausreichend niedrig zu halten. Der Interaktionskoeffizient (12) beträgt 0,006.

3. Langzeitpräzision

Den Ergebnissen der Langzeitpräzisionsmessung liegen die Auswertungen des Routinelabors der Klinik über 15 Monate zugrunde. Wie beschrieben, wird dazu das am Ende der Meßserie eingesetzte Testserum herangezogen. Ein von Schmülling (36) entworfenes Auswertungsprogramm der EDV führt eine Präzisionskontrolle durch, die kontinuierlich von Serie zu Serie, aber auch von Tag zu Tag durchgeführt wird. Damit können Präzisionsschwankungen sensibel überwacht werden. Einer derartigen Langzeitkontrolle mit über 1 bis 1 1/2 Jahren konstantem Serum kommt (nach einer Überprüfungszeit) auch die Funktion einer Richtigkeitskontrolle zu.

Die folgende Tabelle VII veranschaulicht die Stabilität der Methodenpräzision der Methode über 15 Monate nach Einführung. Als Testserum wurde hier Monitrol II XPT 62 mitgeführt.

Tab. VII:

Datum	N (Zahl der Meßserien)	$\bar{x}$ (mg/dl)	s (mg/dl)	VK (%)
18.10.76-11.1. 77	326	219,5	4,7	2,1
-15.3. 77	686	221,1	4,9	2,2
-13.5. 77	1019	220,9	4,9	2,2
-19.7. 77	1399	221,2	5,1	2,3
-16.9. 77	1756	221,2	5,1	2,3
-18.10.77	1937	221,3	5,2	2,3
-15.11.77	2128	221,4	5,2	2,3
-18.1. 78	2506	221,4	5,2	2,3

Im direkten Vergleich, d.h. mit identischem Testserum, zeigte die Vorgängermethode (GOD/POD) am Autoanalyzer folgende Präzision:

18. 8.76-15.10.76	325	227,2	9,3	4,1

Wir können damit zeigen, daß sich durch Methodenumstellung die Präzision der Glucosebestimmung, gekennzeichnet durch den Variationskoeffizienten (VK), von 4,1 % auf 2,3 % verbessert hat.

Anschaulich wird die methodische Verbesserung an den folgenden Kontrollkarten der laufenden Präzisionskontrolle.

Abb. 5: Langzeitpräzision der GOD-Perid-Methode

BZ NUE 12 3201 K O N T R O L L K A R T E 02.11.76 10.31

MITTELW MG/DL	STANDABW MG/DL	VARKOEFF %	ZAHL	+-S	ZAHL	VON	BIS
225,5	7,5	3,3	118	3,0	2	14.10.76	02.11.76
227,3	9,3	4,1	292	4,0	2	19.08.76	13.10.76

AUSDRUCK DER 44. JAHRESWOCHE 1976

EINZELWERTE DES TESTSERUMS BZ NUE

-2S	MITTELWERT	+2S	MG/DL	NR	DATUM
208,7	227,3	245,9			
			224	1	24.10.76 SO
			250	1	25.10.76 MO
			217	2	
			227	3	
			252	4	
			226	1	26.10.76 DI
			224	2	
			227	3	
			228	4	
			221	5	
			223	6	
			226	7	
			233	1	27.10.76 MI
			226	2	
			239	3	
			233	4	
			227	5	
			222	6	
			224	7	
			234	1	28.10.76 DO
			225	2	
			238	3	
			242	4	
			230	5	
			220	1	29.10.76 FR
			215	2	
			227	3	
			225	4	
			226	5	
			227	6	
			224	7	
			233	8	
			220	9	
			220	10	
			226	11	
			223	12	

MITTELWERT DER TESTSERIEN BZ NUE MG/DL DATUM

95%	227,3	95%	MITWERT	N	
			230,5	4	25.10.76 MO
			224,7	7	26.10.76 DI
			229,1	7	27.10.76 MI
			234,8	5	28.10.76 DO
			223,8	12	29.10.76 FR

Abb. 6: Langzeitpräzision der Gluc-DH-Methode

BZ NUE 12 32001 K O N T R O L L K A R T E 12.04.77 10.26

MITTELW	STANDABW	VARKOEFF	ZAHL	+-S	ZAHL	VOM	BIS
MG/DL	MG/DL	%					
221.0	2.5	1.1	115	3.0	5	21.03.77	12.04.77
221.0	4.9	2.2	712	4.0	6	17.10.76	18.03.77

AUSDRUCK DER 15. JAHRESWOCHE 1977

EINZELWERTE DES TESTSERUMS BZ NUE

-2S	MITTELWERT	+2S	MG/DL	NR	DATUM
211.2	221.0	230.8			
			219	1	04.04.77 MO
			223	2	
			220	3	
			222	4	
			222	5	
			225	6	
			224	7	
			221	8	
			222	1	05.04.77 DI
			224	2	
			222	3	
			222	4	
			223	5	
			220	6	
			221	7	
			222	8	
			222	1	06.04.77 MI
			223	2	
			221	3	
			226	4	
			222	5	
			219	6	
			218	7	
			221	8	
			219	1	07.04.77 DO
			220	2	
			216	3	
			222	4	
			221	5	
			218	6	
			221	7	

MITTELWERT DER TESTSERIEN BZ NUE MG/DL

95%	221.0	95%	MIWERT	N	DATUM
			222.0	8	04.04.77 MO
			222.0	8	05.04.77 DI
			221.5	8	06.04.77 MI
			219.6	7	07.04.77 DO

4. Beschreibung der Gluc-DH-Handmethode

Die manuelle Methode ist dem Notfall und Nachtdienst vorbehalten. Sie wird mit derselben Probenvorbereitung, Kapillarabnahme und Enteiweißung und mit derselben Reaktionslösung (Enzymgemisch-Lösung 2) wie die mechanisierte Analyse durchgeführt.
0,1 ml enteiweißter Überstand wird in 1 ml Enzymgemisch bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert; die Absorbance der Probe gegen einen Leerwert, bestehend aus 0,1 ml Wasser und 1,0 ml Enzymgemisch (Lösung 2) bei 334 nm und 1 cm Schichtdicke abgelesen.
Die Berechnung der Glucosekonzentration erfolgt nach

$$C = A_{334} \times 828 \text{ (mg/dl)}$$

$$(C = A_{334} \times 46 \text{ (mmol/l)})$$

Die manuelle Methode erzielt die in der Literatur angegebenen Werte (1,5). Der Zusatz von Triton X 100 zum Reaktionsgemisch bleibt ohne Einfluß. Die Enzymkonzentration des Ansatzes reicht für Glucosekonzentrationen bis 1000 mg/dl ohne weitere Vorverdünnung aus. Ein Überschreiten der Reaktionszeit über weitere 10 Minuten fällt noch nicht ins Gewicht.

Prüfung der manuellen Methode auf Richtigkeit, Linearität und Präzision.

Tab. VIII:

Glucosekonzentration (mg/dl)				
Soll	Ist	s	VK (%)	N
25	25,2	1,1	6,7	20
50	52,2	1,6	3,1	7
100	102,7	2,4	2,4	4
300	293,6	5,0	1,7	6
500	497,3	7,0	1,4	6
1000	983,8	16,7	1,7	18
(wässriger Glucosestandard)				
	219,8	4,4	2,0	99

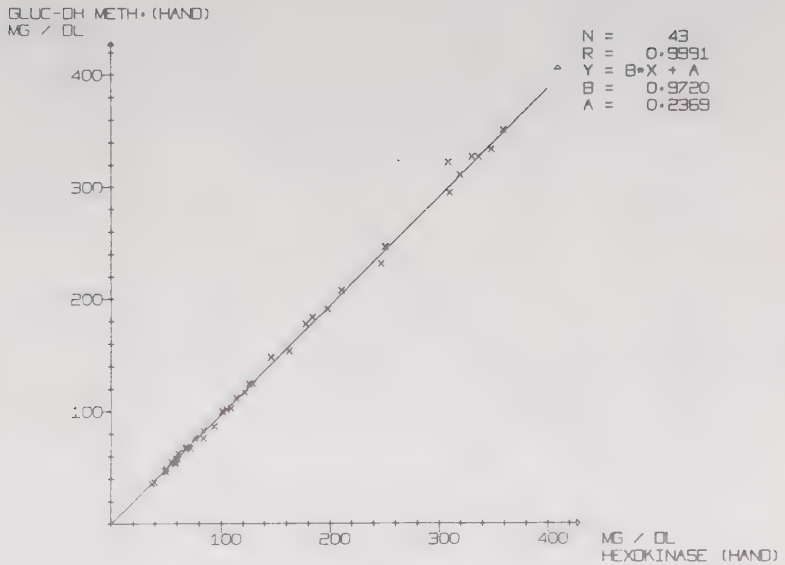
Der obere Tabellenanteil kennzeichnet in seinen ersten beiden Spalten eine gute Wiederfindung des eingesetzten Sollwertes (wässriger Glucosestandard). Die Variation in der Serie (1. und 6. Zeile) beträgt im kritischen Bereich von 25 mg/dl 6,7 % (VK). Problemlos ist die Präzision bis zu 1000 mg/dl mit 1,7 % (VK).
Die Präzision von Tag zu Tag (letzte Zeile) mit 2,0 % (VK) entspricht der mechanisierten Analyse.

5. Methodenvergleiche

Die Methodenvergleiche wurden an Blutglucoseproben von Patienten unserer Klinik durchgeführt. Referenzmethode für die Glucosebestimmung ist die Hexokinase-Methode. Sie wurde seit 1973 im Nacht- und Notdienst benutzt; ferner zur Überprüfung niedriger Glucosewerte am Autoanalyzer (GOD Perid-Methode) verwendet.

Unsere Modifikation der Gluc-DH-Handmethode (Y-Achse) bestätigt die sehr gute Vergleichbarkeit mit der Hexokinase-Methode (x-Achse).

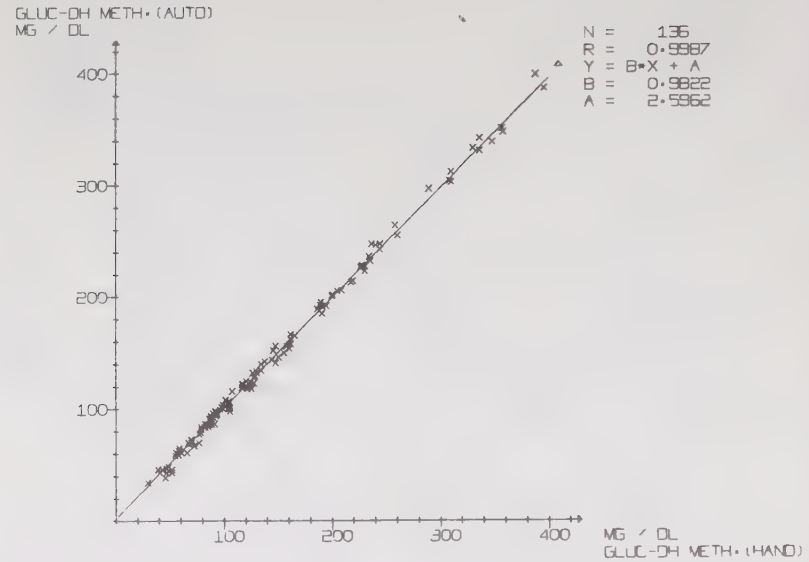
Abb. 7:



REGRESSION DER GLUC-DH (HANDMETHODE)
GEGEN HEXOKINASE (HANDMETHODE)

An 43 Wertepaaren zwischen 30 und 500 mg/dl Glucose-
konzentration demonstriert die Abbildung 7 die auch von
anderen Autoren gezeigte geringe Streubreite (1)

Abb. 8:

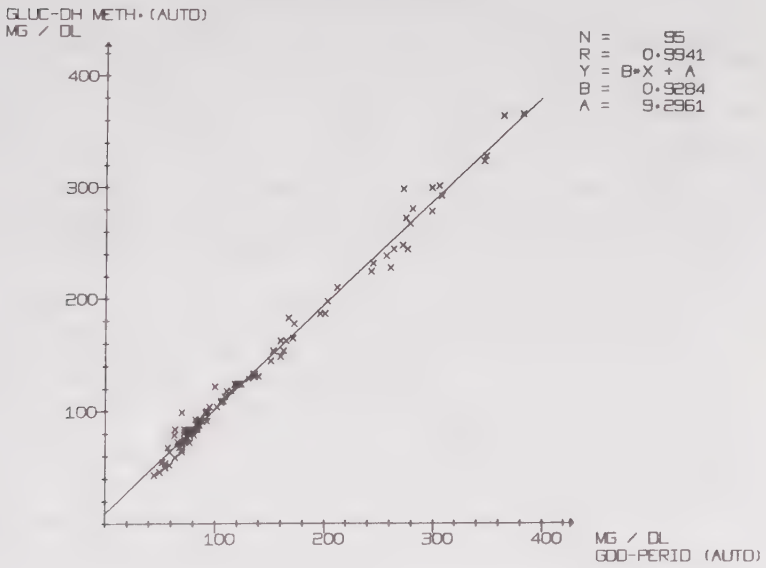


REGRESSION DER GLUC-DH METHODE (AUTOANALYZER)
GEGEN GLUC-DH METHODE (HAND)

Wie erwartet, zeigen sich auch im Methodenvergleich von mechanisierter zur Gluc-DH-Handmethode keine erkennbaren Differenzen: Der aus 136 Wertepaaren ermittelte Korrelationskoeffizient beträgt 0,9987 bei einer praktisch durch den Nullpunkt gehenden Regressionsgeraden:
$y = 0{,}9822 + 2{,}5962$.

Der Vergleich der Gluc-DH-Methode mit der Vorgängermethode GOD-Perid am Autoanalyzer kennzeichnet noch einmal deren Schwächen, die Empfindlichkeit gegenüber reduzierenden Substanzen (Harnsäure, Ascorbinsäure und Gluthation) (15), die zu falsch niedrigen Glucosewerten führen, was besonders bei Werten unter 100 mg/dl ins Gewicht fällt.

Abb. 9:



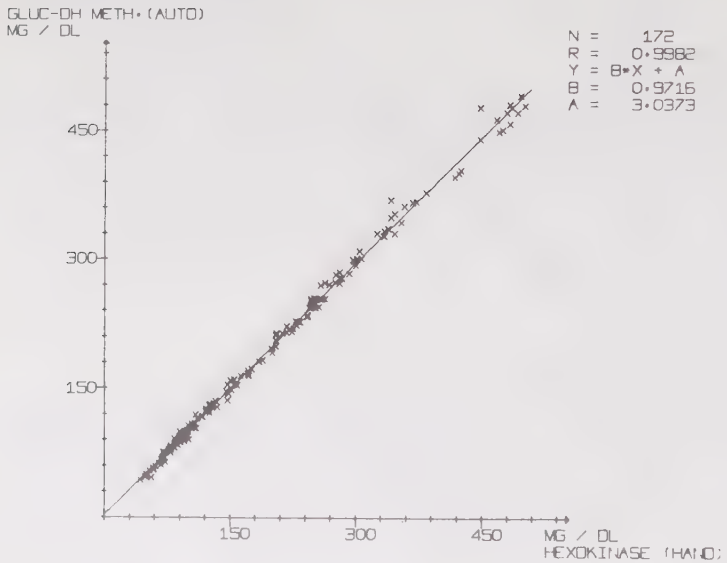
REGRESSION DER GLUC-DH METHODE (AUTOANALYZER)
GEGEN GOD-PERID METHODE (AUTOANALYZER)

So sind in der Abbildung 9 leicht zwei aus der Punkteschar ausbrechende Werte zu erkennen:
70 mg/dl der GOD - gegen 99 mg/dl der Gluc-DH-Methode oder
100 mg/dl der GOD - gegen 122 mg/dl der Gluc-DH-Methode.

Trotz einer guten Korrelation R = 0,9941 ist durch die Tendenz zu falsch niedrigen Werten bei der GOD-Methode die Regressionsgerade im unteren Bereich angehoben:

$$y = 0{,}9284\ x + 9{,}2961.$$

Abb. 10:



REGRESSION DER GLUC-DH METHODE (AUTOANALYZER)
GEGEN HEXOKINASE (HANDMETHODE)

Der Methodenvergleich der Gluc-DH-Methode am Autoanalyzer mit der Referenzmethode rechtfertigt schließlich deren Einführung in die Routine. Abbildung 10 zeigt 172 im Routinebetrieb ermittelte Glucosewerte zwischen 30 und 500 mg/dl der Gluc-DH-Methode und die entsprechenden Werte der Hexokinase-Methode. Die Regressionsgerade $y = 0{,}9716\ x + 3{,}0373$ geht annähernd durch den Nullpunkt. Die Punkteschar zeigt eine fast ideale Korrelation: $R = 0{,}9982$.

6. Störungen und Spezifität der Methode

Störungen durch Hämoglobinkonzentrationen im Plasma bis zu 20 g/l werden nicht beobachtet. Erst höhere Konzentrationen führen durch Absorption zu höheren Glucosewerten.

Bilirubinwerte bis 15 mg/dl (260 mmol/l) sind ohne Einfluß; erst darüber hinaus muß man mit falsch erhöhten Glucosewerten rechnen: z.B. 40 mg/dl Bilirubin entsprechen einer Erhöhung der Glucosekonzentration um 9 mg/dl).

Lipämische Seren mit Triglyceridwerten bis 3100 mg/dl (35 mmol/l) waren ohne nachweisbaren Einfluß.

Ein Gesamteiweiß von 4 bis 12 g/dl stört nicht. Dagegen wird bei einer Eiweißkonzentration unter 3 g/dl Uranylacetat nicht ausreichend niedergeschlagen und stört durch seine Eigenfarbe die Basislinie des Schreiberbildes. Für die Liquorglucosebestimmung ist deshalb Perchlorsäure-Perchlorat als Enteiweißungsmittel erforderlich.

Die bakterielle Gluc-DH wurde Glucose-selektiv beschrieben (1).
Inzwischen ist die Spezifität der Gluc-DH etwas eingeschränkt worden. So gibt Banauch u.a. folgende Mitreaktionen an:

Deoxyglucose	125 %
Glucosamin	31 %
D-Xylose	15 %
D-Mannose	8 %

Glucosamin und D-Mannose sind im klinischen Bereich ohne Bedeutung.

Die Deoxyglucose, benutzt im Test nach Hollander (40) zur vagalen Reizung und Prüfung des therapeutischen Effekts der Vagotomie, ist heute praktisch nicht mehr im Gebrauch: Sie würde zu einer völligen Verfälschung der Glucosewerte führen. Aber auch während einer oralen oder parenteralen Xylose-Belastung sind falsch hohe Glucosewerte zu erwarten. Die Xylose-Belastung ist damit auch der einzig relevante Störfaktor der Gluc-DH-Methode.

V. DISKUSSION

Die Einführung einer neuen klinisch-chemischen Methode in die Routine bedarf strenger Anforderungen. Der Glucosewert ist neben Kalium der für die Klinik folgenträchtigste Laborparameter. Die Sicherheit der Bestimmung hängt direkt von einem einfachen, schnellen handling ab. Bisher stand mit der GOD-Perid-Methode eine für alle Analysengeräte praktikable Methode zur Verfügung. Nachteil dieser enzymatischen Methode war jedoch ein Mangel an Spezifität, der durch einen zweiten Reaktionsschritt, einen H-Ionen-Donator-Farbstoff verursacht war: Vorkommen falsch niedriger Werte durch Harnsäureerhöhung, Einflußnahme durch oxidierende oder reduzierende Reinigungsmittel. Der Hauptfehler bestand in der mangelnden Richtigkeit hypoglykämischer Werte. Wegen der Anforderungen an Richtigkeit und Spezifität kam nur eine enzymatische Bestimmungsmethode in Frage.
Hexokinase ist zwar als Referenzmethode seit Jahren beschrieben (37), auch auf alle gängigen Analysatoren adaptiert, gegen ihren routinemäßigen Gebrauch sprechen aber: die empfindlicheren Reagenziensysteme, die zweistufige und damit kompliziertere enzymatische Reaktion und Kostengründe.
Als neue Referenzmethode eignet sich das Gluc-DH-System vor allem wegen seiner Empfindlichkeit gegen Deoxyglucose nicht (42). Im übrigen bietet die Gluc-DH eine Alternative zu den bisherigen Verfahren (17,19,23). Bewährt hat sich die schon bisher einheitliche Probennahme: in der Tagesroutine, bei Glucosetoleranzprüfungen, im Notfall und Nachtdienst. Die kapillare Probennahme ist so einfach, daß kooperative ambulante Patienten die Blutentnahme zu Hause durchführen können. Gehfähige stationäre Patienten kommen zur Blutentnahme in den Laborbereich.
Durch die einheitliche Abnahme lassen sich die Differenzen von venöser und kapillarer Abnahme (6) vermeiden. Manuelle und mechanisierte Analyse führen zu vergleichbaren

Ergebnissen. Die kapillare Mikroprobennahme durch geübtes Personal bringt, wie wir zeigen konnten, keine nachweisbare Verschlechterung der Präzision mit sich. Zudem paßt sie sich auch pädiatrischen Belangen und Forderungen der Intensivmedizin an.
Die Enteiweißung durch Uranylacetat wird der durch Perchlorsäure vorgezogen. Uranylacetat führt zu einer leichter zentrifugierbaren, feineren Ausflockung. Sie ist weniger aggressiv als Perchlorsäure. Lediglich für die Liquorglucosebestimmung empfehlen wir Perchlorsäure.
Am Autoanalyzer erspart die Enteiweißung die vorbereitende Hämolyse und die Dialyse. Damit erhöht sich die Empfindlichkeit und Betriebsicherheit der Methode. Außerdem stoppt die Enteiweißung die Glykolyse. Der durch die Enteiweißung bedingte Volumenverdrängungseffekt ist bei einer Verdünnung von 2 + 50 bei etwa 0,6 % und damit tolerabel (9).

Von entscheidendem Vorteil gegenüber den gängigen Hexokinasesystemen ist das einfache handling der Gluc-DH-Methode:
Mit Gluc-DH ist nur eine einstufige chemische Reaktion durchzuführen. Es muß lediglich eine Reaktionslösung angesetzt werden, die bei Raumtemperatur 4 Wochen, bei 4°C monatelang stabil bleibt.
Die Wirtschaftlichkeit des Analysensystems trägt neben einer möglichst unbegrenzten Haltbarkeit der Lösungen zur Drosselung des Enzymverbrauchs bei. Dabei dürfte die Empfindlichkeit des Systems nicht spürbar leiden, und Enzymaktivität müßte auch für zu erwartende hohe Glucosekonzentrationen zur Verfügung stehen. Durch hohe Verdünnung (2 + 50) des Substrats und Austitrieren der Enzymmenge kommen wir mit 5,2 U Gluc-DH pro Analyse aus, während vergleichbare Verfahren (37) die doppelte Enzymmenge umsetzen.
Der Analysenbereich reicht dabei im mechanisierten System bis 500 mg/dl (22 mmol/l), im manuellen System bis 1000 mg/dl (55,5 mmol/l) und wurde hinsichtlich Richtigkeit und Präzision dargelegt.

Im niedrigen Konzentrationsbereich ist die Methode bis zu 30 mg/dl (1,7 mmol/l) verwendbar. Ein mittlerer Fehler von 3 mg/dl (0,17 mmol/l) in diesem kritischen Bereich ist für klinische Zwecke völlig ausreichend; die Diagnostik hypoglykämischer Situationen - z.B. bei Insulinbelastungen - ist damit gewährleistet.

Die mechanisierte Analyse am Autoanalyzer II ist einfach in Aufbau, Bedienung und Wartung. Dialysatoren und Thermostate werden nicht benötigt. Einzige Verschleißteile sind Pumpenschläuche, die monatlich gewechselt werden.

Durch die Zuordnung einer Kurzlochkarte zur Probe im turntable des Autoanalyzers, deren Inhalt vom EDV-System gelesen wird, das dann den analogen Meßwert des Photometers eindeutig ermittelt, besteht in unserem System eine positive Probenidentifizierung. Sie reduziert die Gefahr von Probenverwechslungen entscheidend.

Die von der EDV gelieferte Qualitätskontrolle durch die Beurteilung jedes Präzisionsserums am Serienende, ermöglicht die sofortige Weitergabe der Werte an den Arzt oder ein rasches Erkennen methodischer Fehler.

Die Zuverlässigkeit des Verfahrens wird durch die Dokumentation der 15-monatigen routinemäßigen Präzisionskontrolle gezeigt. Bei unverändertem Testserum betrug die Langzeitpräzision 2,2 %. Maximale wöchentliche Präzisionsschwankungen waren zwischen 1,1 % und 2,9 %. Bei einem stetigen Wechsel der die Analyse durchführenden Assistentin zeigt sich, daß die Sicherheit der Methode vom bedienenden Personal weitgehend unabhängig ist.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Eine 1975 neu beschriebene enzymatische Methode zur Glucosebestimmung wurde auf den Autoanalyzer II adaptiert.
Wir benutzten die im Routinebetrieb der Med.Klinik Tübingen bewährte Mikroprobenabnahme (20 µl Kapillarblut).
Nach Enteiweißung mit Uranylacetat eignen sich die Proben ebenso für manuelle Bestimmungen. Die einstufige Reaktion der Gluc-DH mit Glucose, die Benutzung einer praktisch unbegrenzt haltbaren Reaktionslösung vereinfacht die Handhabung am Autoanalyzer II. Bei etwas geringerer Spezifität sind Richtigkeit und Präzision mit der Hexokinasemethode vergleichbar. Die EDV-Anlage unserer Klinik gestattet eine real-time-Präsentation der Befunde unter einer kontinuierlichen Präzisionskontrolle. Die Zuverlässigkeit der Methode wird durch eine kontrollierte Erfahrung im Routinelabor über 15 Monate dokumentiert.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1) BANAUCH, D., W. BRÜMMER, W. EBELING, H. METZ, H. RINDFREY, H. LANG, K. LEYBOLD und W. RICK:
Eine Glucose-Dehydrogenase für die Glucose-Bestimmung in Körperflüssigkeiten.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 13, 101-107 (1975)

2) BARTHELMAI, W. und R. CZOK:
Enzymatische Bestimmungen der Glucose in Blut, Liquor und Harn.
Klin. Wschr. 40, 585-589 (1962)

3) BIOT, J.B.:
Mémoire sur les rotations que certaines substances impriment aux aces de polarisation des rayon lumineux.
Mém.Acad.Sci.Inst.France 2, 41-136 (1817)

4) BOCK, H.E. und M. EGGSTEIN:
Diagnostik Informationssystem
Berlin, Heidelberg, New York
Springer 1970

5) DOLHOFER, R., L. WEISS und O.H. WIELAND:
Erfahrungen mit der Glucose-Dehydrogenase-UV-Methode zur Bestimmung der Blutglucose.
J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 14, 415-417 (1976)

6) DUBACH, U., J. BIERENS DE HAAN, W. BÜRGL, H.H. MÄRKI und R. ZENDER:
Methodologische Aspekte der Glucosebestimmung.
Rundtischgespräch an der 13. Generalversammlung der Schweizerischen Vereinigung für Klinische Chemie, Lugano, 20.4.1969
Schweiz.med.Wschr. 100, 234-237 (1970)

7) FITZGERALD, M.G. and H. KEEN:
Diagnostic Classification of Diabetes.
Lancet I, 1325-1326 (1964)

8) FRANKE, W. und M. DEFFNER:
Zur Kenntnis der sogenannten Glucose-oxydase II.
Justus Liebig Ann. Chem. 541, 117-150 (1939)

9) GERBIG, K.:
Eine neue hochspezifische und praktikable Methode zur Glucosebestimmung mit Glucose-Dehydrogenase.
Med. Lab. 29, 1-12 (1976)

10) HARDING, U. und G. HEINZEL:
Vollautomatische Bestimmung des Blutzuckers nach der Hexokinasemethode.
Z.Klin.Chem. 7, 640-643 (1969)

11) HILGENFELDT, J., B. PAPNER, R. KATTERMANN, K.v.DAHL, P. HEIDRICH und F.H. SCHMIDT:
Glucosebestimmung im Autoanalyzer II mittels Hexokinase-Technik im Hämolysat.
Med. Lab. 30, 278-286 (1977)

12) HJELM, M.:
Quality Control of Automated Analytical Systems in Clinical Chemistry.
Z. Anal.Chem. 243, 781-790 (1968)

13) HUGGET, A.S. and D.A. NIXON:
Use of glucose oxidase, peroxidase and o-dianisidine in determination of blood and urinary glucose.
Lancet II, 368-370 (1957)

14) HULTMAN, K.:
Rapid spezific method for determination of aldosaccharides in body fluids.
Nature (London) 183, 108-109 (1959)

15) KAHLE, K., L. WEISS, M. KLARWEIN und O. WIELAND:
Klinisch-chemische Erfahrungen mit einem neuen Chromogen für die Blutzuckerbestimmung nach der GOD/POD-Methode unter Verwendung eines automatischen Analysiergerätes.
Z.analyt.Chem. 252, 228-231 (1970)

16) KEILIN, D. und E.F. HARTREE:
Biological Catalysis of Mutarotation of Glucose.
Biochem. J. 50, 341-348 (1952)

17) KELLER, H., V. WOLF, U. FAUST, W. BLEICHER und J. BECKER:
Ein Verfahren zur enzymkinetischen Bestimmung von Glucose.
J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 14, 27-30 (1976)

18) KÖNIG, R., H. DAUWALDER und R. RICHTERICH:
Vergleichende Bestimmungen der Uringlucosekonzentration mit der Polarimetrie und einer enzymatischen Methode (Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase).
Schweiz.med.Wschr. 101, 860-866 (1971)

19) KORNMÜLLER? K.J. und O. MÜLLER-PLATHE:
Reagenziensparende Modifikation der Glucose-Dehydrogenase-Methode für den Auto-Analyzer II zur Glucosebestimmung in Venen- und Kapillarblut.
J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 15, 603-605 (1977)

20) KUTTER, D.:
Hemmung der enzymatischen Blutzuckerbestimmung durch Ascorbinsäure und Gentisinsäure.
Ärztl. Lab. 7, 175-176 (1961)

21) LORENZ, K.:
Blutzuckerschnellbestimmung mit Anilin-Eisessig.
Z.Klin.Chem. 1, 127-128 (1963)

22) MÜLLER, D.:
Studien über ein neues Enzym Glucoseoxydase I.
Biochem.Z. 199, 136-170 (1928)

23) MÜLLER-MATTHESIUS, R.:
Enzymkinetische Glucosebestimmung nach der Glucose-Dehydrogenase-Methode.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 13, 187-189 (1975)

24) NEELEY, W.E.:
Simple Automated Determination of Serum or Plasma Glucose by a Hexokinase/Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase Method.
Clin.Chem. 18, 509-515 (1972)

25) O'GORMAN, P., P.D. GRIFFITHS and R. HAZEL:
Ascorbic acid inhibition of the glucose oxidase test for glucosuria.
Brit.med.J. I, 603-606 (1960)

26) RICHTERICH, R.:
Klinische Chemie 66-67
Akademische Verlagsgesellschaft Frankfurt
Frankfurt 1968

27) RICHTERICH, R. und J.P. COLOMBO:
Ultramikromethoden im klinischen Laboratorium II. Die Bestimmung der Zuverlässigkeit von Laboratoriumsmethoden.
Klin. Wschr. 40, 529-533 (1962)

28) RICHTERICH, R. und J.P. COLOMBO:
Vereinfachte enzymatische Bestimmung der Blut-Glucose mit 20 Mikroliter Blut.
Klin. Wschr. 40, 1208-1211 (1962)

29) RICHTERICH, R., H. KÜFFER, E. LORENZ und J.P. COLOMBO:
Die Bestimmung der Glucose in Plasma und Serum (Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Methode) mit dem Greiner Electronic Selective Analyzer GSA II.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 12,5-13 (1974)

30) RINDFREY, H., R. HELGER and H. LANG:
Kinetic Determination of Glucose Concentrations with Glucose Dehydrogenase.
J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 15, 217-220 (1977)

31) ROMMEL, K. und R. WEPLER:
Klinische Chemie und Präventivmedizin.
J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 15, 245-248 (1977)

32) SLEIN, M.W., G.T. CORI and C.F. CORI:
A comparative study of hexokinase from yeast and animal tissues.
J.Biol.Chem. 186, 763-780 (1950)

33) SCHADEWALDT, H., in:
Handbuch der Inneren Medizin.
Bd. 7, Stoffwechselkrankheiten
T. 2A, 1-44
Berlin, Heidelberg
Springer 1975

34) SCHMIDT, F.H.:
Methoden der Blut- und Harnzuckerbestimmung unter besonderer Berücksichtigung enzymatischer Verfahren.
Fortschritte der Diabetesforschung
Stuttgart
Thieme 1963

35) SCHMIDT, F.H.:
Fehlmessungen der Harnglucose durch Polarisation.
Dtsch. med. Wschr. 92, 2025-2027 (1967)

36) SCHMÜLLING, R., W. GRÄSER und M. EGGSTEIN:
Methoden der Informatik in der Medizin.
159-169
Berlin, Heidelberg, New York
Springer 1975

37) SCHOLER, A. und A. PIANEZZI:
Mikromethode zur Bestimmung der Glucosekonzentration mit Glucose-Dehydrogenase auf dem Autoanalyzer.
J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 14, 189-195 (1976)

38) SCHREIBER, J. und R. LACHENICHT:
Bestimmung der Glucose nach der GOD-Perid-Methode mit dem Technicon SMA 6/60.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 1, 31-34 (1973)

39) SCHUMACHER, J.:
Die Geschichte des Diabetes mellitus bis zur Insulin-Ära.
Dtsch.med.J. 22, 707-715 (1963)

40) STALDER, G.A.:
Zur Frage der klinischen Verwendbarkeit des 2-Desoxy-D-Glukose-Tests für die Prüfung der Vagusfunktion.
Schweiz.med.Wschr. 100, 1218-1219 (1970)

41) TEUSCHER, A., R. RICHTERICH, W. BÜRGI, W. DETTWILER und K. ZUPPINGER:
Neue schweizerische Richtlinien zur Diagnose des Diabetes mellitus.
Schweiz.med.Wschr. 101, 345-352 (1971)

42) WASSER, E.:
Erfahrungen mit einer neuen Glucosebestimmungsmethode auf dem Greiner Selective Analyzer II (GSA II).
J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 15, 109-113 (1977)

43) WICHELOW, M.J., A. WIGGLESWORTH, B.D. COX, W.J.H. BUTTERFIELD and M.E. ABRAMS:
Critical Analysis of Blood Sugar Measurements in Diabetes Detection and Diagnosis.
Diabetes 16, 219-226 (1967)

44) WRENSHALL, G.A., G. HETENYI and W.R. FEASBY:
Insulin. (The Story of Insulin)
Oldenburg, Hamburg
Stalling 1962

45) YEE, H.Y.:
Automated Hexokinase Procedure for Assaying Glucose in Urin, Serum or Plasma.
Clin.Chem. 18, 1416-1419 (1972)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. M. Eggstein für die Überlassung des Themas und die Großzügigkeit, mit der er die Arbeit in den Laboratorien der Medizinischen Universitätsklinik ermöglicht hat.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz.Dr.R.-M. Schmülling für die Anregungen und Ideen zur Durchführung des Themas.

Mein Dank gilt Herrn Dr. W. Stein, der die Publikation der Methode ermöglicht und sie im Routinelabor weiter betreut hat, Herrn Dipl.Phys.H.M.Frauer, der die Methode an die zentrale Rechenanlage adaptiert hat und Herrn Dr. R. Maulbetsch für die Unterstützung bei der statistischen Bearbeitung der Dissertation.

L e b e n s l a u f

Am 4.3.1942 wurde ich, Ingbert Mildner, als Sohn des Lehrers Hans Mildner und seiner Frau Karolina, geb. Speth, in Neuler geboren.

Meine Schulausbildung erhielt ich in Neuler, Biberach und Tübingen (Volksschule, Neusprachliches und Humanistisches Gymnasium), wo ich am 3.3.1961 das Abitur bestand.

Das Medizinstudium begann ich in Tübingen und schloß es dort am 1.8.1968 mit dem Staatsexamen ab.

Die Approbation erhielt ich am 13.1.1971 nach 18 Monaten chirurgischer und internistischer Medizinalassistentenzeit.

Meine Ausbildung zum Laborarzt (Anerkennung am 23.10.1975) erfolgte überwiegend in der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen bei Prof. Dr. M. Eggstein, kurzfristig bei Prof.Dr.R.-E.Bader (Hygiene Institut der Universität Tübingen) und im bakteriologischen Laboratorium des Ernst-Rodenwald-Instituts in Koblenz während meiner Wehrdienstzeit.

In der derzeitigen Ausbildung zum Internisten bin ich Wissenschaftlicher Angestellter der Medizinischen Klinik, Abteilung IV, Ärztl. Direktor: Prof.Dr.M.Eggstein, unterbrochen durch ein halbes Jahr Tätigkeit in der Abteilung I (Gastroenterologie), Ärztl. Direktor: Prof.Dr.W.Dölle und ein Jahr Radiologie im Medizinischen Strahleninstitut, Direktor: Prof.Dr.W.Frommhold.